

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金(循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業)

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

主任研究者の報告書

13. 絶食がラットの B 群ビタミン動態におよぼす影響

—長期絶食による尿中, 血中, 肝臓中, 筋肉中ビタミン量の推移—

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究」において, 1~3 日間絶食させたラットの尿中, 血中, 肝臓中, 筋肉中ビタミン量を調べた。ラットを含む哺乳動物は絶食期間によって 3 つの代謝段階を移行することが知られている。3 つの代謝段階とは, それぞれ主要エネルギー源が糖質(Phase 1), 脂質(Phase 2), タンパク質(Phase 3)であり, 体重減少率および血中ケトン体, 血中窒素濃度によって判断される。前述の研究は Phase 1 ~Phase 2 の段階にあたる。本研究では, 対照群と Phase 2 群に加え, ラットを長期間絶食させて Phase 3 に移行したことを確認後, 屠殺解剖をおこない, 血中, 肝臓中, 臓器中の全 B 群ビタミン量を測定した。また, 飼育期間中毎日採尿し, 尿中 B 群ビタミン排泄量の推移を測定した。尿中 B 群ビタミン排泄量は絶食により減少するが, パントテン酸とビオチンは例外であり, 絶食 3 日目に最大値を示した。血中 B 群ビタミン濃度は, ビタミン B₁₂, ナイアシンを除く全てのビタミンが絶食により減少した。全ての B 群ビタミンの肝臓中濃度は絶食により減少した。筋肉中 B 群ビタミン量は, 変化のみられなかったナイアシンとビオチンを除いて, 絶食により減少した。しかしながら, ビタミン B₂, ビタミン B₁₂ は長期絶食により濃度が上昇した。Phase 2, Phase 3 の二群間において有意差が認められたものは, 血中ビタミン B₁, パントテン酸, 葉酸, ビオチン濃度であり, いずれも Phase 3 群で低値を示した。同様に, 肝臓ではビタミン B₁, ビタミン B₂, 葉酸に有意差が認められた。筋肉では, パントテン酸および葉酸は Phase 3 群で減少し, 反対にビタミン B₂, ビタミン B₁₂ は Phase 3 群で高値を示した。これらの B 群ビタミン動態について, 絶食期間中のエネルギー代謝との関連は見出せなかった。

A. 目的

哺乳動物は絶食期間にともない主要エネルギー源が糖質、脂質、タンパク質の順に変化する¹⁾。多くのB群ビタミンはエネルギー代謝に関わる酵素の補酵素としての役割を担っているため、絶食期間による主要エネルギー源の変化とともに各々の代謝に関連するビタミン量が随時減少していくことが予想される。例えば、「①ビタミンB₁はチアミンニリン酸としてピルビン酸デヒドロゲナーゼの脱炭酸反応に関与しているため、糖質を主要エネルギー源とする絶食初期(Phase 1)に必要な量が增大する。②パントテン酸はCoAの補欠分子族である4'-ホスホパンテインの構成成分であり、脂質代謝とのかかわりが深いため、脂質を主要エネルギー源とする絶食中期(Phase 2)に必要な量が增大する。③ビタミンB₆はピリドキサーリン酸としてアミノ酸のアミノ基転移酵素、アミノ酸脱炭酸酵素などに関与しているため、たんぱくを主要エネルギー源とする絶食後期(Phase 3)に必要な量が增大する。」という仮説を立てた。この仮説を検証するために、ラットを短期または長期間絶食させ、尿中、血液中、肝臓中、筋肉中B群ビタミン量を測定した。

また、絶食が生体におよぼす影響を確認するために、体重、臓器重量、血液指標の測定も行った。

B. 実験方法

1. 動物飼育

本研究は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。8週齢のWistar系雄ラットを日本クレア株式会社より購入し、1匹ずつラット用代謝ケージ(CT-10, 日本クレア株式会社)で飼育した。飼育室の温度は22℃前後、湿度は50%前後、12時間の明暗サイクル(午前6時から午後6時までを明)とした。

通常精製飼料で一週間予備飼育後、対照群(CONT, n=5)の解剖を行った。残りのラットは2日間(Phase 2, n=5)またはPhase 3に到達するまで(Phase 3, n=5)絶食させた。Phase 3群のラットは1匹ずつ体重減少率を確認し、連続2日間の上昇がみられた段階で屠殺した。最終的な絶食日数は6~9(7.4±0.5)日間であった。飼育期間中、毎日採尿をおこなった。尿は腐敗防止のために1Mの塩酸1mLを含む三角フラスコ中に集め、尿量を測定後、分析に用いるまで-20℃にて冷凍保存した。飼育最終日に断頭屠殺したラットの全血液をEDTA-2K入りの試験管に採取し、全血または遠心分離(7,000 × g, 30分)によって得られた血漿を分析に用いた。また、即座に解剖して大脳、心臓、肺、胃、腎臓、肝臓、脾臓、精巣を摘出し、重量を測定した。肝臓、大腿四頭筋(筋肉)を適当な大きさに切り取り、超純水でホモゲナイズした。尿、血液および肝臓、筋肉ホモジネート中のB群ビタミン量を測定した。

2. 分析

2-1. ビタミンB₁の測定

尿中の遊離型チアミン量を測定するために、尿を直接HPLCによる分析に供した。定量方法は文献2に示したポストカラム-HPLC法にしたかった。血中および肝臓、筋肉中の総ビタミンB₁濃度はチアミンとチアミンニリン酸の合計量とし、試料にトリクロロ酢酸溶液を加えて除タンパク後、尿と同様の方法で定量した。

2-2. ビタミンB₂の測定

尿中の遊離型リボフラビン量を測定するために、尿を直接HPLCによる分析に供した³⁾。血中および肝臓、筋肉中の総ビタミンB₂濃度は、リボフラビン、FMN、FADを光分解してルミフラビンとした後、HPLC法により定量した⁴⁾。

2-3. ビタミンB₆とその関連化合物の測定

尿中のビタミン B₆ 異化代謝産物である 4-ピリドキシニン酸 (4-PIC) 量を測定するために、尿を直接 HPLC による分析に供した⁵⁾。血漿中および肝臓、筋肉中のピリドキサーール、ピリドキサーールリン酸濃度を測定するために、試料にメタリン酸を加えて除タンパク後、HPLC による分析に供した⁶⁾。これらの合計量をビタミン B₆ 濃度として示した。

2-4. ビタミン B₁₂ の測定

尿、血漿、肝臓、筋肉中ビタミン B₁₂ 量を測定するために、シアン化カリウム存在下で試料中のビタミン B₁₂ をシアノコバラミンに変換し、安定化処理を行った。その処理液を *Lactobacillus leichmanii* ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法に供した⁷⁾。

2-5. ニコチンアミドとその関連化合物の測定

尿中のニコチンアミドおよびその異化代謝産物量は、ニコチンアミド、N¹-メチルニコチンアミド (MNA)、N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py)、N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) の合計量として示した。尿中のニコチンアミド、2-Py、4-Py は文献 8 に示した HPLC 法で同時定量した。尿中 MNA 含量は文献 9 に示した HPLC 法にて定量した。血中および肝臓、筋肉中総ニコチンアミド濃度は、文献 10 に示した HPLC 法にて定量した。

2-6. パントテン酸の測定

尿中の遊離型パントテン酸量を測定するために、尿を *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に供した¹¹⁾。血漿中パントテン酸濃度は、加熱による除タンパク後の上清を微生物学的定量法に供して測定した¹¹⁾。肝臓、筋肉中総パントテン酸濃度を測定するために、ホスファターゼ・パンテテイナーゼ処理をおこない、結合型パントテン酸を遊離型に変換後、微生物学的定量法に供した¹¹⁾。

2-7. 葉酸の測定

尿中葉酸量を測定するために、尿を直接 *Lactobacillus casei* ATCC 27773 を用いた微生物学的定量法に供した¹²⁾。血漿中葉酸濃度も同様の方法で測定した¹²⁾。肝臓、筋肉中葉酸濃度を測定するために、プロテアーゼ・コンジュガーゼ処理をおこない、葉酸を遊離型に変換後、微生物学的定量法に供した¹²⁾。

2-8. ビオチンの測定

尿中の遊離型ビオチン量を測定するために、尿を直接 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に供した。血漿、肝臓、筋肉中総ビオチン濃度を測定するために、試料に硫酸溶液を加えてオートクレーブし、結合型ビオチンを遊離型に変換後、微生物学的定量法に供した。測定は文献 13 を参考に、比濁法にて行った。

2-9. 血液検査

尾静脈中 3-ヒドロキシ酪酸濃度は測定キット (アボット ジャパン株式会社) を用いて測定した。血漿中グルコース、TG、尿素窒素、AST、ALT は富士ドライケム (富士フィルム株式会社) にて測定した。測定した尿素窒素値に 2.14 を乗じて尿素濃度として表した。3-ヒドロキシ酪酸は脂質異化代謝を、尿素濃度はたんぱく異化代謝を反映するため、代謝段階の確認に利用した。

3. 統計処理

数値はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。値の比較には一元配置分散分析を用い、有意差が認められた場合には Tukey の多重比較検定を行った。p 値が 0.05 未満のとき、統計学的有意差があるものとみなした。分析には GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) の GraphPad Prism 5 を使用した。

C. 結果

1. 絶食期間と体重および臓器重量の関係

絶食前 (CONT 群) と短期絶食 (Phase 2), 長期絶食 (Phase 3) 群の体重および臓器重量を表 1 に示した. 体重は絶食 1 日目に平均で 16.7 g 減少し, その後は毎日 10 g 程度減少しつづけた. また, Phase 3 群の絶食期間中の体重減少率を図 1 に示した.

大脳, 肺, 胃の重量は, 絶食によって変化しなかった. 心臓と精巣重量は短期絶食では変わらず, 長期絶食によってそれぞれ 30%, 10% 減少した. 腎臓, 肝臓, 脾臓は絶食期間にともない徐々に減少し, 最終的な減少率はそれぞれ 26%, 66%, 66% であった.

2. 絶食期間と血液パラメーターの関係

表 2 にラットの血液パラメーターを示した. 全血中 3-ヒドロキシ酪酸濃度は Phase 2 群で CONT 群に比して 25 倍に上昇し, Phase 3 群では元の値に戻った. 血漿中グルコース濃度は Phase 2 群で約 40% 減少したが, Phase 3 群では元の値に戻った. 血漿 TG 濃度は Phase 2 群で急激に減少し (73% 減), その後も有意ではないが低下傾向を示した (85% 減). 血漿尿素濃度は Phase 3 群においてのみ増加した (75% 増). 血漿中 AST 濃度には変化がみられなかった. ALT 濃度は Phase 3 群で 1.8 倍に増加した.

3. 絶食期間と尿中 B 群ビタミン排泄量の関係

絶食による尿中 B 群ビタミン排泄量の変動を図 2 に示した. 尿中チアミン排泄量は絶食 1 日目から急激に減少し (88% 減), その後は横ばいとなった. リボフラビン, 4-PIC, ビタミン B₁₂ および葉酸は絶食日数にともない徐々に減少し, 絶食 4 日目前後で一定値となった (それぞれ 68%, 83%, 42% 減). ニコチンアミドとその異化代謝産物, パントテン酸, ビオチンはそれぞれ絶食 1 日目, 3~4 日目, 1~5 日目に絶食前よりも高い尿

中排泄量となり, 最大値をとった日の尿中排泄量はそれぞれ絶食前の 1.5, 1.7, 3.4 倍であった.

4. 絶食期間と血中 B 群ビタミン量の関係

絶食による血中 B 群ビタミン濃度の変動を図 3 に示した. 変動のみられなかったビタミン B₁₂, ニコチンアミドを除く全ての B 群ビタミン濃度は絶食日数にともない減少した. 最終的にビタミン B₁ は 40% 減, ビタミン B₂ は 32% 減, ビタミン B₆ は 35% 減, パントテン酸は 71% 減, 葉酸は 56% 減, ビオチンは 64% 減であった.

5. 絶食期間と肝臓中 B 群ビタミン量の関係

絶食による肝臓中 B 群ビタミン濃度の変動を図 4 に示した. ビタミン B₁, ビタミン B₂, 葉酸, ビオチン濃度は絶食日数にともない減少した. 残りのビタミン B₆, ビタミン B₁₂, ニコチンアミド, パントテン酸濃度は絶食により減少したが, Phase 2 群と Phase 3 群の間に有意差は認められなかった. 最終的な肝臓中含量はビタミン B₁, ビタミン B₂, ビタミン B₆, ニコチンアミドで CONT 群の約 1/2 であり, パントテン酸は 25% 減, ビタミン B₁₂ とビオチンは 60% 減, 葉酸は 65% 減であった.

6. 絶食期間と筋肉中 B 群ビタミン量の関係

絶食による筋肉中 B 群ビタミン量の変動を図 5 に示した. ビタミン B₁, ビタミン B₆ 濃度は絶食により減少したが (それぞれ 53%, 40% 減), Phase 2 群と Phase 3 群の間に有意差は認められなかった. ビタミン B₂, ビタミン B₁₂ 濃度は Phase 2 群で減少し (それぞれ 55%, 65% 減), Phase 3 群では元の値に戻った. パントテン酸, 葉酸濃度は Phase 3 群においてのみ減少した (それぞれ 72%, 45% 減). ニコチンアミド, ビオチン濃度は絶食による影響をうけなかった.

D. 考察

本研究は絶食期間の違いがラットの生体指標およびビタミン動態におよぼす影響を明らかにすることを目的として、0, 2, 6~8 日間絶食させたラットの体重、臓器重量、血液指標および尿、血液、肝臓、筋肉中の B 群ビタミン量を測定した。

体重減少率より、絶食 7.4 ± 0.5 日目のラットを Phase 3 群とした。全血中 3-ヒドロキシ酪酸濃度は Phase 2 群で上昇し、Phase 3 群では元に戻った。また、血漿中尿素濃度は Phase 3 群で有意に上昇した。このことから、Phase 2 群では脂質を、Phase 3 群ではタンパクを主要なエネルギー源としていることが確認できた。

血漿中グルコース濃度について、Phase 2 群では減少し、Phase 3 群では対照群と差が認められなかった理由として、糖新生の影響が考えられるが、どの段階で糖新生が盛んになるのかについては現在検討中である。

2 日間の絶食により重量が減少した臓器は腎臓、肝臓、脾臓であり、過去の研究とも一致している。本研究の結果より、心臓、精巣重量は長期絶食により減少することが証明された。

B 群ビタミンの尿中排泄パターンは、大きく 3 つに分けられる。一つ目は、絶食により減少して一定値を示すものであり、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂、葉酸が挙げられる。二つ目は、絶食の初期段階に増加してその後減少するもので、ナイアシン、ビオチンがこれにあたる。残りのパントテン酸は、絶食初期は減少し、その後増加した。

血液中 B 群ビタミン量は、ビタミン B₁₂、ナイアシンを除く全てのビタミンが絶食により減少した。ナイアシンは絶食による体タンパクの崩壊により生じたトリプトファンから生合成されるため血中濃度が維持されたと考えられるが、ビタミン B₁₂

については不明である。

肝臓中の全ての B 群ビタミン量は、絶食により減少した。しかしながら、これは肝臓重量の減少 (66%減) によるものであり、肝臓中ビタミン含量は最も減少した葉酸で 65%減であったことから、肝臓中ビタミン濃度は維持されている、あるいは増加していた。

筋肉中 B 群ビタミン量は、絶食初期に減少するもの (ビタミン B₁、ビタミン B₆)、その後増加するもの (ビタミン B₂、ビタミン B₁₂)、絶食後期に減少するもの (パントテン酸、葉酸)、変化しないもの (ナイアシン、ビオチン) の 4 つのパターンに分類できた。ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆ については、過去の報告との矛盾がみられるため、更なる検討の必要性がある。

なお、本研究において絶食段階のちがいにともなう B 群ビタミンの必要量の変化について 3 つの仮説を立てたが、血中ビタミン B₁ およびパントテン酸濃度は Phase 2 群でも維持されていたこと、ビタミン B₆ 濃度は血中、肝臓中、筋肉中の全てにおいて、Phase 2 群と Phase 3 群との間に有意差が認められなかったことから、これらの仮説は否定された。しかしながら、脂質代謝に関与するビタミン B₂ の筋肉中濃度が Phase 2 群でのみ減少していたという事実は、絶食中期の脂質代謝が筋肉で活性化されていることを示唆しているかもしれない。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許予定
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 引用文献

1. Le Maho Y, Vu Van Kha H, Koubi H, Dewasmes G, Girard J, Ferre P, Cagnard N. Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long-term fasting geese. *Am J Physiol* (1981) 41, E342-E354.
2. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己. 代謝攪乱物質ビスフェノール A のトリプトファン - ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部. *食品衛生学雑誌* (2004) 45, 231-8.
3. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* (1983) 258, 5623-8.
4. Ohakawa H, Ohishi N, Yagi K. A simple method for micro-determination of flavin in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. *Biochem Int* (1982) 4, 187-94.
5. Gregory JF 3rd, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* (1979) 32, 879-83.
6. Rybak ME, Pfeiffer CM. Clinical analysis of vitamin B6: determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. *Anal Biochem* (2004) 333, 336-44.
7. Watanabe F, Abe K, Katusra H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B12 degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* (1998) 46, 5177-80.
8. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-8.
9. Shibata K. Ultramicro-determination of *N*¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* (1987) 61, 599-604.
10. Shibata K. High-performance liquid chromatographic determination of nicotinamide in rat tissue samples and blood after extraction with diethyl ether. *J Chromatogr* (1987) 422, 257-62.
11. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-6.
12. Tamura T. "Microbiological assay of folates" in *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*. ed by Picciano MF, Stolstad ELR, Gregory JF, III, pp. 121-37, Wiley-Liss, New York, USA. (1990)

表 1. 絶食期間とラットの体重, 臓器重量の関係

	CONT	Phase 2	Phase 3
体重 (g)	253 ± 3 ^a	219 ± 6 ^b	167 ± 5 ^c
臓器重量 (g, 湿重量)			
大脳	1.29 ± 0.02	1.28 ± 0.01	1.23 ± 0.03
心臓	0.84 ± 0.04 ^a	0.81 ± 0.04 ^a	0.58 ± 0.02 ^b
肺	1.28 ± 0.08	1.09 ± 0.06	0.95 ± 0.06
胃	1.16 ± 0.02	1.14 ± 0.04	1.19 ± 0.08
腎臓	1.94 ± 0.05 ^a	1.69 ± 0.03 ^b	1.43 ± 0.04 ^c
肝臓	11.18 ± 0.23 ^a	6.07 ± 0.19 ^b	3.83 ± 0.42 ^c
脾臓	0.75 ± 0.04 ^a	0.50 ± 0.05 ^a	0.25 ± 0.04 ^b
精巣	2.75 ± 0.07 ^a	2.66 ± 0.04 ^{ab}	2.45 ± 0.06 ^b

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 5) として示した. 異なる添字は有意差を示す.

表 2. 絶食期間とラットの血液パラメーターの関係

	CONT	Phase 2	Phase 3
全血			
3-ヒドロキシ酪酸 (mM)	0.1 ± 0.0 ^a	2.5 ± 0.2 ^b	0.3 ± 0.1 ^a
血漿			
グルコース (mM)	6.36 ± 0.28 ^a	3.84 ± 0.29 ^b	6.44 ± 0.60 ^a
TG (mM)	3.01 ± 0.45 ^a	0.81 ± 0.07 ^b	0.46 ± 0.05 ^b
尿素 (mM)	7.45 ± 0.27 ^a	6.21 ± 0.30 ^a	13.08 ± 0.68 ^b
AST (U/L)	263 ± 21	242 ± 21	252 ± 8
ALT (U/L)	39.8 ± 3.8 ^a	31.8 ± 1.8 ^a	73.3 ± 5.9 ^b

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 5) として示した. 異なる添字は有意差を示す.

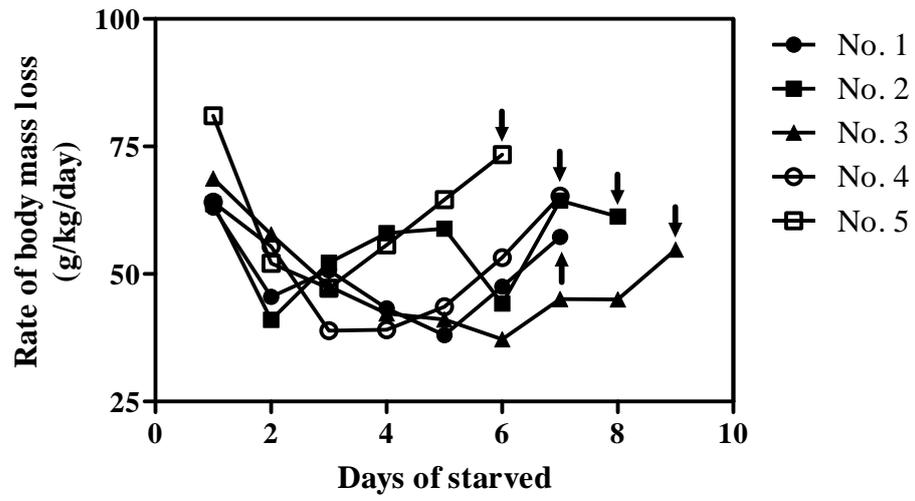


図 1. Phase 3 群の絶食期間中の体重減少率. 矢印は屠殺日を示す.

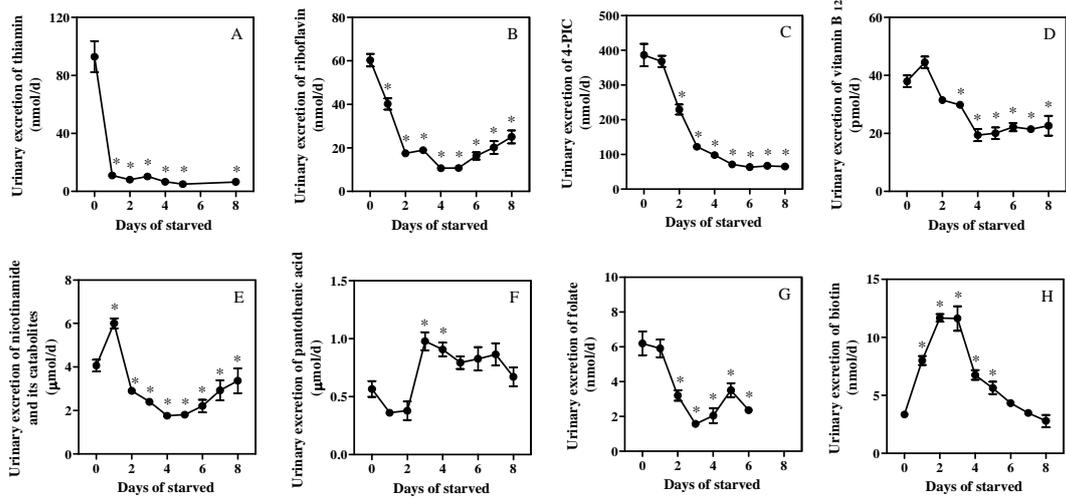


図 2. 絶食期間と尿中ビタミン排泄量の関係

尿中ビタミン B₁ (A), ビタミン B₂ (B), ビタミン B₆ 代謝産物 (C), ビタミン B₁₂ (D), 総ニコチンアミド代謝産物 (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H). 値は平均値 ± 標準誤差 (n = 5). *絶食前 (Day 0) と比較した有意差を示す.

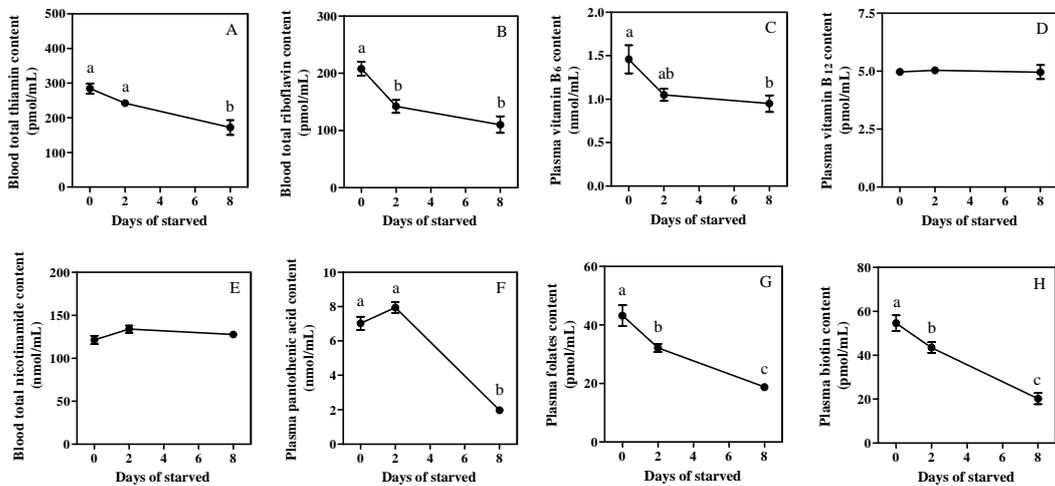


図 3. 絶食期間と血中ビタミン量の関係

血中ビタミン B₁ (A), ビタミン B₂ (B), ビタミン B₆ (C), ビタミン B₁₂ (D), 総ニコチンアミド (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H). 値は平均値 ± 標準誤差 (n = 5). Day 0 に CONT 群, Day 2 に Phase 2 群, Day 8 に Phase 3 群の値を示した. 異なる添字は有意差を示す.

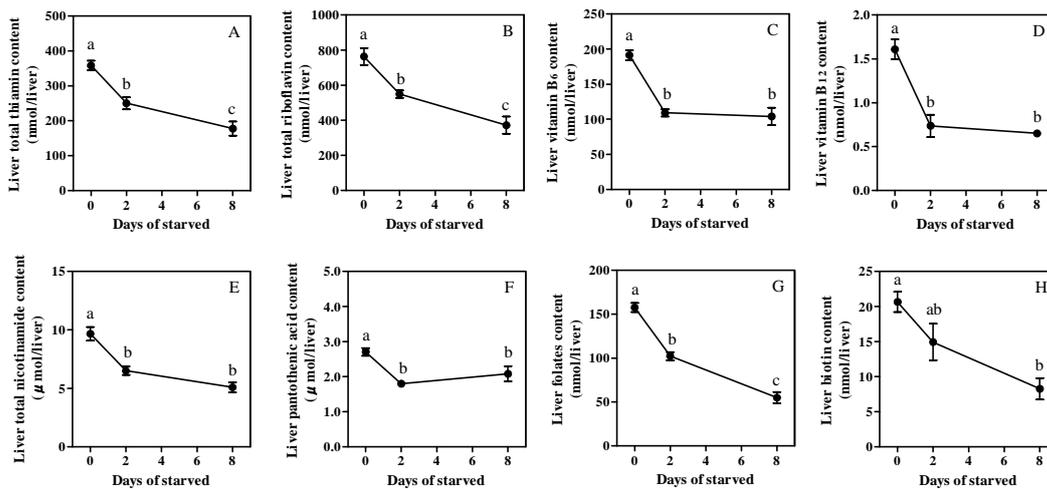


図 4. 絶食期間と肝臓中ビタミン量の関係

肝臓中ビタミン B₁ (A), ビタミン B₂ (B), ビタミン B₆ (C), ビタミン B₁₂ (D), 総ニコチンアミド(E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H). 値は平均値 ± 標準誤差 (n = 5). Day 0 に CONT 群, Day 2 に Phase 2 群, Day 8 に Phase 3 群の値を示した. 異なる添字は有意差を示す.

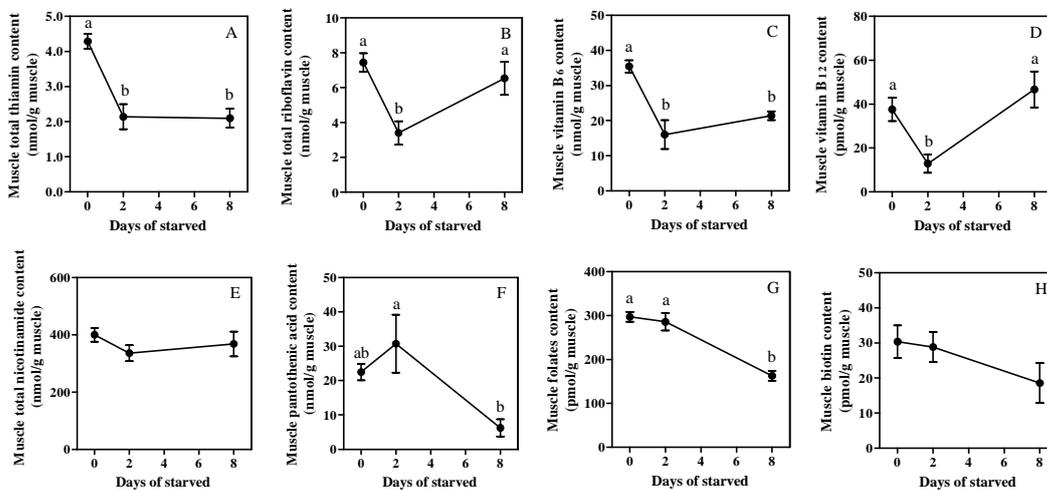


図 5. 絶食期間と筋肉中ビタミン量の関係

筋肉中ビタミン B₁ (A), ビタミン B₂ (B), ビタミン B₆ (C), ビタミン B₁₂ (D), 総ニコチンアミド(E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H). 値は平均値±標準誤差 (n = 5). Day 0 に CONT 群, Day 2 に Phase 2 群, Day 8 に Phase 3 群の値を示した. 異なる添字は有意差を示す.